

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 : C07H 21/00		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/41811
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 27. December 1996 (27.12.96)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP96/02459		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, JP, KR, NO, NZ, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 6. Juni 1996 (06.06.96)			
(30) Prioritätsdaten: 195 20 398.4 8. Juni 1995 (08.06.95) DE 195 37 985.3 12. Oktober 1995 (12.10.95) DE		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; D-68298 Mannheim (DE).			
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KLEIBER, Jörg [DE/DE]; Unterholzstrasse 22, D-82377 Penzberg (DE). WALTER, Thomas [DE/DE]; Alte Tölzer Strasse 10, D-83673 Bichl (DE). HARTTIG, Herbert [DE/DE]; Feuerbachstrasse 11, D-67122 Altrip (DE). LESNIAK, Christoph [DE/DE]; Mühlenstrasse 20, D-66111 Saarbrücken (DE). MENNIG, Martin [DE/DE]; Mittelstrasse 5, D-66895 Quierschied (DE). RIEDLING, Michael [DE/DE]; Albertstrasse 9, D-66125 Saarbrücken (DE). SCHMIDT, Helmut [DE/DE]; Im Königsfeld 29, D-66130 Saarbrücken (DE).			
(74) Gemeinsamer Vertreter: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH; Patentabteilung, D-68298 Mannheim (DE).			
(54) Title: MAGNETIC PIGMENT			
(54) Bezeichnung: MAGNETISCHES PIGMENT			
(57) Abstract <p>Magnetic particles have a substantially pore-free outer glass surface, or an outer glass surface with pores having less than 10 nm diameter. Ferromagnetic particles with a glass surface are preferably used to isolate biological materials from samples. They ensure a rapid and reliable purification.</p>			
(57) Zusammenfassung <p>Magnetische Partikel mit einer äußeren Glasoberfläche, die im wesentlichen porenfrei ist oder Poren eines Durchmessers von weniger als 10 nm aufweist sowie ferromagnetische Partikel mit einer Glasoberfläche, sind bevorzugt einsetzbar bei der Isolierung von biologischen Materialien aus Proben. Sie gewähren eine rasche und zuverlässige Reinigung.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

Magnetisches Pigment

Gegenstand der Erfindung sind magnetische Partikel mit einer Glasoberfläche, Verfahren zur Reinigung eines biologischen Materials, insbesondere von Nukleinsäuren unter Verwendung von Glaspartikeln in Gegenwart chaotroper Salze, Verfahren zur Isolierung dieser biologischen Materialien und Verfahren zur Konzentrierung biologischen Materialien und die Überführung von biologischen Materialien aus Lösungen mit hoher Konzentration an Salzen in Lösungen mit niedriger Konzentration an Salzen.

Manche biologischen Materialien, insbesondere Nukleinsäuren, stellen im Hinblick auf ihre Isolierung aus der natürlichen Umgebung besondere Anforderungen. Zum einen sind sie oft in sehr geringen Konzentrationen vorhanden und zum anderen befinden sie sich oft in Nachbarschaft vieler anderer fester und gelöster Substanzen, die ihre Isolierung, beziehungsweise Bestimmung, beeinträchtigen.

In jüngerer Zeit hat es daher nicht an Versuchen gefehlt, Verfahren und Materialien zur Isolierung von Nukleinsäuren aus ihrer natürlichen Umgebung vorzuschlagen. Aus Proc. Natl. Acad. USA 76, 615 - 619 (1979) ist die Bindung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen in Gegenwart von Natriumjodid in gemahlenem Flintglas beschrieben.

In Anal. Biochem. 121, 382 - 387 (1982) ist die Reinigung von Plasmid DNA aus Bakterien an Glasstaub in Gegenwart von Natriumperchlorat beschrieben.

In DE-A 37 34 442 ist die Isolierung von einzelsträngiger M13 Phagen-DNA an Glasfaserfiltern durch Ausfällung der Phagenpartikel mit Hilfe von Essigsäure und Lyse der Phagenpartikel mit Perchlorat beschrieben. Die an die Glasfaserfilter gebundenen Nukleinsäuren werden nach Waschen mit einem methanolhaltigen Puffer in Tris/EDTA-Puffer eluiert.

In Anal. Biochem. 175, 196- 201 (1988) ist ein ähnliches Verfahren zur Reinigung von DNA aus Lambdaphagen beschrieben.

Den bisher genannten Verfahren des Standes der Technik ist die selektive Bindung von Nukleinsäuren an Glasoberflächen in chaotropen Salzlösungen gemeinsam, wobei die Nukleinsäure von Verunreinigungen wie Agarose, Proteinen oder Zelltrümmern abgetrennt wird. Zur Separierung der Glaspartikel von den Verunreinigungen wird nach dem Stand der Technik entweder Zentrifugation von Partikeln oder Durchsaugen von Flüssigkeiten durch Glasfaserfilter verwendet. Hierbei handelt es sich jedoch um einen limitierenden Schritt, der die Verarbeitung großer Probenzahlen stark behindert.

In Anal. Biochem. 201, 166 - 169 (1992) bzw. PCT GB 91/00212 ist die Verwendung von Magnetpartikeln zur Immobilisierung von Nukleinsäuren nach Ausfällung durch Zugabe von Salz und Ethanol beschrieben. Hierbei findet eine Agglutination der Nukleinsäuren unter Einschluß der Magnetpartikel statt. Das Agglutinat wird von dem ursprünglichen Lösungsmittel durch Anlegen eines Magnetfeldes und Waschen getrennt. Nach einem Waschschriff werden die Nukleinsäuren in einem Trispuffer gelöst. Dieses Verfahren hat jedoch den Nachteil, daß die Ausfällung nicht selektiv für Nukleinsäuren ist, sondern eine Vielzahl von festen und gelösten Stoffe mitagglutiniert werden. So ist es durch dieses Verfahren nicht möglich, eventuell vorhandene Inhibitoren für bestimmte enzymatische Reaktionen in ausreichendem Maße zu entfernen.

In US-A-4,233,169 ist ein poröses Glas beschrieben, das Magnetpartikel eingelagert enthält.

Auf dem Markt befindet sich derzeit auch sogenanntes magnetisches, poröses Glas, welches Magnetpartikelchen in einer porösen, partikulären Glasmatrix enthält, und wobei die Oberfläche von einer streptavidinhaltigen Schicht überzogen ist. Dieses Produkt kann zur Isolierung von biologischen Materialien, zum Beispiel Proteinen oder Nukleinsäuren verwendet werden, wenn diese in einem aufwendigen Vorbereitungsschritt so modifiziert werden, daß diese kovalent an Biotin gebunden sind.

Aufgabe der Erfindung war es, bessere Materialien zur Immobilisierung von biologischen Materialien und ein einfaches und für die Routine-Diagnostik geeignetes Verfahren zur Isolierung von biologischen Materialien, insbesondere Nukleinsäuren, bereitzustellen.

Gegenstand der Erfindung sind magnetische Partikel mit einer äußeren Glasoberfläche, die im wesentlichen porenfrei ist oder Poren eines Durchmessers von weniger als 10 nm aufweist. Ein weiterer Gegenstand sind ferromagnetische Partikel mit einer Glasoberfläche, Verfahren zur Isolierung biologischer Materialien, insbesondere von Nukleinsäuren, sowie Verfahren zur Herstellung magnetischer Glaspartikel.

Als Partikel bezeichnet der Fachmann feste Materialien mit einem geringen Durchmesser. Manchmal bezeichnet man solche Partikel auch als Pigmente. Im Sinne der vorliegenden Erfindung sind besonders Partikel geeignet, die eine durchschnittliche Korngröße von weniger als 100 μm haben. Besonders bevorzugt weisen sie eine durchschnittliche Korngröße von zwischen 10 und 60 μm auf. Bevorzugt ist die Korngrößenverteilung relativ homogen, insbesondere liegen nahezu keine Teilchen $< 10\mu\text{m}$ oder $> 60\mu\text{m}$ vor.

Als magnetisch werden Materialien bezeichnet, die durch einen Magnet angezogen werden können, d. h. beispielsweise ferromagnetische oder superparamagnetische Materialien. Als magnetisch werden auch Materialien verstanden, die als weich magnetische Materialien bezeichnet werden, z. B. Ferrite. Besonders bevorzugt im Sinne der Erfindung sind ferromagnetische Materialien, insbesondere wenn sie noch nicht vormagnetisiert wurden. Unter Vormagnetisierung ist in diesem Zusammenhang das Inkontaktbringen mit einem Magneten zu verstehen, wodurch die Remanenz erhöht wird. Besonders bevorzugt sind ferromagnetische Materialien, wie z. B. Magnetit (Fe_3O_4) oder Fe_2O_3 .

Unter einer äußeren Oberfläche eines Partikels wird die zusammenhängende Oberfläche verstanden, von der in Richtung auf die Umgebung des Partikels Senkrechte gebildet werden können, die dasselbe Partikel nicht noch einmal schneiden.

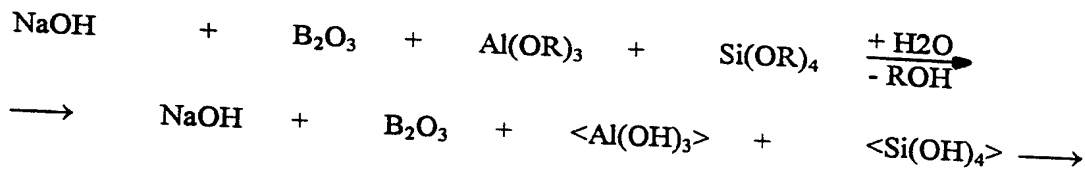
Unter eine Pore wird eine Ausnehmung in der äußeren Oberfläche des Partikels verstanden, bei denen die Oberfläche soweit in das Partikel hineinreicht, daß eine in der Ausnehmung auf der Oberfläche gebildete gedachte Senkrechte in Richtung auf die nächstliegende Umgebung des Partikels das Partikel mindestens 1mal schneidet. Poren reichen außerdem tiefer als ein Radius der Pore in das Partikel hinein.

Unter einem Glas im Sinne der vorliegenden Erfindung wird ein siliciumhaltiges amorphes Material verstanden. Das Glas kann weitere Materialien enthaltenen, z. B.

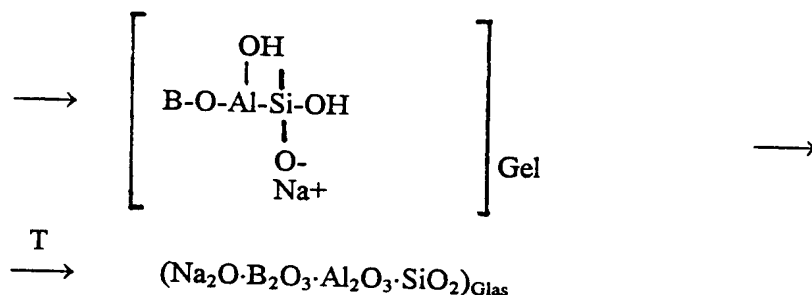
- 4 -

B ₂ O ₃	(0 - 30 %),
Al ₂ O ₃	(0 - 20 %),
CaO	(0 - 20 %),
BaO	(0 - 10 %),
K ₂ O	(0 - 20 %),
N ₂ O	(0 - 20 %),
MgO	(0 - 18 %),
Pb ₂ O ₃	(0 - 15 %).

In geringerem Umfang von 0 - 5 % können auch eine Vielzahl anderer Oxide, wie z. B. Mn₂O₃, TiO₂, As₂O₃, Fe₂O₃, CuO, CoO usw. enthalten sein. Als besonders wirksam haben sich Oberflächen einer Zusammensetzung von Borsilikatglas, Flintglas oder Silica erwiesen. Unter dem Gesichtspunkt der Ausbeute an Nukleinsäuren besonders bevorzugte Borsilikatgläser haben einen Boroxidgehalt von mehr als 25 %; als besonders wertvoll wurde ein Glas der Zusammensetzung SiO₂/B₂O₃ 70/30 erkannt. Besonders bevorzugt im Sinne der Erfindung sind Gläser, die durch den sogenannten Gel-Solprozeß und anschließendes Trocknen und Verdichten der gebildeten Schicht gebildet werden. Dieser Prozeß ist in seinen Grundzügen bekannt und wurde z. B. in C.J. Brinker, G.W. Scherer "Sol Gel science - The physics and chemistry of Sol Gel Processing", Academic Press Inc. 1990 und Sol-Gel Optics, Processing and Applications Lisa C. Klein Ed. Kluwer Academic Publishers 1994, Seite 450 ff. sowie in DE-A-1941191, DE-A-3719339, DE-A-4117041 und DE-A-4217432 beschrieben. Er wurde allerdings bisher noch nicht für magnetische Partikel beschrieben. Daß hiermit magnetische Partikel erzeugt werden können, die bei der Isolierung von biologischen Materialien, insbesondere Nukleinsäuren, ganz überraschende Eigenschaften haben, war nicht zu erwarten. Im Gel-Sol-Prozeß werden Alkoxide von netzwerkbildenden Komponenten, z. B. SiO₂, B₂O₃, Al₂O₃, TiO₂, ZrO₂, GeO₂ zusammen mit Oxiden und Salzen anderer Komponenten, z. B. in alkoholischer Lösung, vorgelegt und hydrolysiert. In der Gleichung ist die Herstellung von einem Natriumboroaluminiumsilikatglas aufgeführt.



- 5 -



Durch die Zugabe von Wasser wird der Hydrolyseprozeß der Ausgangskomponenten in Gang gesetzt. Die Reaktion verläuft relativ rasch, da die Alkaliionen katalytisch auf die Hydrolysegeschwindigkeit des Kieselsäureesters einwirken. Nach Ablauf der Gelbildung kann das entstehende Gel getrocknet und durch einen thermischen Prozeß zu einem Glas verdichtet werden.

Das Mengenverhältnis Sol/Pigment hat einen erheblichen Einfluß auf die Ausbeute an erfindungsgemäßen magnetischen Pigment. Grenzen sind dadurch gegeben, daß der Pigmentanteil so gering ist, daß eine noch pump- und sprühfähige Masse entsteht. Bei zu geringem Pigmentanteil wird der Feinanteil, z. B. von nicht-magnetischem Material zu groß und stört. Als im Hinblick auf die Pigmentaushbeute zweckmäßige Mengenverhältnisse wurden 10 bis 25 g Pigment/100 ml Sol gefunden.

Die Aufschlammung wird zur Entstehung eines Pulvers bevorzugt durch eine Düse versprüht und das Aerosol auf einer Fallstrecke getrocknet. Die Düse wird bevorzugt geheizt, um die Trocknung der Aufschlammung zu beschleunigen. Abhängig von der Geometrie der Düse beträgt die Düsenteperatur bevorzugt ca. 120 bis 200°C. Ein Kompromiß wird gefunden durch ausreichende Verdampfungsgeschwindigkeit, jedoch Vermeiden von Verspritzen.

Im Hinblick auf die Ausbeute ist die Verdichtungstemperatur möglichst hoch zu wählen. Ist sie jedoch zu hoch, verkleben die Partikel untereinander und es bilden sich Agglomerate, die herausgesiebt werden sollten. Die Nachbehandlung unter Luft führt bei zu hohen Temperaturen zu einem Verlust der magnetischen Eigenschaften, weshalb zu hohe Temperaturen vermieden werden sollten.

Unter einer im wesentlichen porenfreien Oberfläche wird eine Oberfläche verstanden, die zu weniger als 5 %, bevorzugt weniger als 2 %, besonders bevorzugt weniger als 0.1 %, mit

Poren der oben stehenden Definition durchsetzt ist. Sollten Poren vorhanden sein, so haben diese bevorzugt einen Durchmesser von weniger als 10, besonders bevorzugt 1 nm.

Besonders bevorzugt im Sinne der Erfindung sind Partikel, die einen Kern aus mit TiO_2 beschichteten Glimmer und darauf immobilisierten Magnetitpartikeln enthalten, wobei der so gebildete Verbundstoff von der Glasschicht umschlossen ist. Sowohl der Kern als auch die Magnetitpartikel sind kristallin und nicht porös. Die Räume auf der Oberfläche des Glimmers, welche nicht von den Magnetitpartikeln besetzt ist, sind von einer dickeren Glasschicht überzogen als die Spitzen der Magnetitpartikel, so daß sich eine im wesentlichen nicht-poröse Glasoberfläche ergibt.

Die Nichtporosität der magnetischen Partikel bezieht sich nur auf die äußere Oberfläche, nicht auf das Innere des Partikels, so daß das Partikel in seinem Inneren porös sein kann, wenn die Oberfläche nur von im wesentlichen porenfreiem Glas oder einer Glasoberfläche mit Poren eines Durchmessers von weniger als 10 nm umschlossen ist.

Überraschenderweise sind die erfindungsgemäßen magnetischen Partikel besonders vorteilhaft zur Isolierung biologischer Materialien aus Proben geeignet. Insbesondere werden lange Nukleinsäuren sehr wenig oder gar nicht zerstört, wenn sie daran immobilisiert werden. Das Material des Kerns ist darüber hinaus eine natürliche Ressource und somit ökologisch wenig bedenklich. Die Herstellung der erfindungsgemäßen Partikel ist darüber hinaus sehr wenig aufwendig und kostengünstig.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung sind ferromagnetische Partikel mit einer Glasoberfläche. Im Stand der Technik sind superparamagnetische Partikel beschrieben. Es hat sich nun herausgestellt, daß ferromagnetische Partikel, wenn sie mit einer Glasoberfläche überzogen sind, erhebliche Vorteile bei der Isolierung von biologischen Materialien aufweisen. Solange die ferromagnetischen Partikel noch keinem Magnetfeld ausgesetzt waren, sedimentieren sie ausschließlich unter Einfluß der Schwerkraft. Sie sind durch Schütteln einfach und schnell wieder zu suspendieren. Der Vorgang der Abscheidung ohne Magnetfeldeinfluß verläuft dabei bevorzugt langsamer als die Immobilisierung biologischer Materialien an ihrer Oberfläche. Dies gilt insbesondere für Nukleinsäuren. Die ferromagnetischen Partikel können auf einfache Weise mittels eines Magneten an einer bestimmten Stelle der Probenflüssigkeit gesammelt werden, um die Flüssigkeit von den Partikeln und somit den immobilisierten biologischen Materialien zu trennen.

Die Glasoberfläche der erfindungsgemäßen ferromagnetischen Partikel kann porenfrei sein oder aber Poren enthalten. Aus den oben genannten Gründen für die erfindungsgemäßen magnetischen Partikel ist es bevorzugt, daß die äußere Oberfläche auch der ferromagnetischen Partikel im wesentlichen porenfrei ist oder Poren eines Durchmessers von weniger als 10 nm aufweist. Auch die erfindungsgemäßen ferromagnetischen Partikel haben bevorzugt eine Korngröße zwischen 10 und 60 µm, besonders bevorzugt 20 und 50 µm. Besonders bevorzugt sind Partikel, bei denen eventuell in der Oberfläche vorhandene Poren einen Durchmesser von weniger als 10, besonders bevorzugt 1 nm haben. Ein Beispiel für einen erfindungsgemäßen ferromagnetischen Partikel ist der oben genannte Verbundstoff aus Glimmer- und Magnetitpartikeln, umschlossen von einer Glasschicht.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Isolierung eines biologischen Materials durch

- Inkontaktbringen einer Probe, die das biologische Material in einer Flüssigkeit enthält, mit den erfindungsgemäßen magnetischen Partikeln oder den erfindungsgemäßen ferromagnetischen Partikeln unter Bedingungen, bei denen das biologische Material an die Partikeloberfläche bindet, und
- Abtrennung des biologischen Materials von der Flüssigkeit.

Unter biologischen Materialien werden Materialien auf partikulärer oder molekularer Basis verstanden. Hierzu gehören insbesondere Zellen, z. B. Viren und Bakterien aber auch humane und tierische isolierte Zellen, wie Leukozyten, sowie immunologisch aktive nieder- und hochmolekulare chemische Verbindungen, wie Haptene, Antigene, Antikörper und Nukleinsäuren. Besonders bevorzugt sind Nukleinsäuren, z. B. DNA oder RNA.

Proben im Sinne der Erfindung sind beispielsweise klinische Proben, wie Blut, Serum, Mundspülflüssigkeit, Urin, Zerebralflüssigkeit, Sputum, Stuhl, Punktate und Knochenmarkproben. Die Probe kann auch aus dem Bereich der Umweltanalytik, der Lebensmittelanalytik oder der molekularbiologischen Forschung, z. B. aus Bakterienkulturen, Phagenlysaten und Produkten von Amplifikationsverfahren, z. B. PCR, stammen.

Erfindungsgemäß haben die magnetischen Partikel einen inneren Kern, auf den die äußere Glasoberfläche aufgebracht ist. Bei dem Kern kann es sich um einen Verbundstoff, jedoch

auch um einfache Eisenkerne handeln. Der Kern kann auch aus einer kristallinen oder keramischen oder glasartigen Struktur bestehen, in die Eisenoxid eingelagert ist.

Mit dem geschilderten Verfahren kann natives oder modifiziertes biologisches Material isoliert werden. Unter nativem biologischem Material wird Material verstanden, dessen Struktur gegenüber den natürlich vorkommenden biologischen Materialien nicht irreversibel verändert wurde. Dies schließt jedoch nicht die Modifizierung anderer Bestandteile der Probe aus. Sollen beispielsweise Zellen isoliert werden, so kann zwar das die Zellen umgebende Medium modifiziert sein, nicht jedoch die Zellen als solche. Sollen Nukleinsäuren isoliert werden, so sollen auch diese in der nativen Form, d. h. nicht denaturiert, geschnitten oder durch Ankoppelung reaktiver Gruppen modifiziert sein. Der Begriff natives biologisches Material umfaßt daher insbesondere biotinylierte Nukleinsäuren nicht. Beispiele für native biologische Materialien sind Phagen-DNA oder zelluläre Nukleinsäuren aus Blut.

Modifizierte biologische Materialien umfassen Materialien, die nicht in der Natur vorkommen, z. B. Nukleinsäuren, die durch Anheftung reaktiver, nachweisbarer oder zur Immobilisierung befähigenden Gruppen modifiziert sind, z. B. biotinylierte Nukleinsäuren.

In bestimmten Fällen kann die Probe ohne Vorbehandlung in das erfindungsgemäße Isolierungsverfahren eingesetzt werden. In vielen Fällen sollte die Probe jedoch durch eine geeignete Methode aufgeschlossen und das in der Probe enthaltende biologische Material freigesetzt werden. Verfahren zum Aufschluß von Proben sind dem Fachmann bekannt und können chemischer, enzymatischer oder physikalischer Natur sein. Auch eine Kombination dieser Verfahren ist möglich. Beispielhaft genannt sei Lyse durch Ultraschall, Hochdruck oder durch Scherung, durch Alkali, Detergenzien oder chaotrope Salzlösungen, oder durch Einwirkung von Proteinasen oder Lipasen. Speziell im Hinblick auf die Aufschlußverfahren zum Erhalt von Nukleinsäuren wird auf Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Addition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY und Ausubel et al.: Current Protocols in Molecular Biology 1987, J. Wiley and Sons, NY, verwiesen.

Die Probe kann neben dem zu isolierenden biologischen Material weitere Bestandteile, z. B. Zelltrümmer, Proteine, Salze und weitere nicht zu isolierende Stoffe in einer Flüssigkeit enthalten. Diese Probe, die bevorzugt das biologische Material in nativer Form enthält, wird unter Bedingungen, bei denen das gewünschte biologische Material an die Partikeloberfläche bindet, mit den Partikeln in Kontakt gebracht. Die Bedingungen hierfür hängen von

der Art des biologischen Materials ab, sind jedoch prinzipiell bekannt. Sie richten sich auch nach der Art der Bindung, über die das biologische Material an die Oberfläche gebunden wird. Sollen beispielsweise immunologische Wechselwirkungen für die Bindung ausgenutzt werden, so müssen Bedingungen gewählt werden, die für die Bildung von Immunkomplexen geeignet sind. Für Nukleinsäuren ist im Fall der modifizierten Nukleinsäuren eine Bindung über die Gruppen der Nukleinsäuren möglich, die die Modifizierung darstellen, z. B. Biotin über die Bindung an mit Streptavidin beschichtete Oberflächen. Insbesondere bei Nukleinsäuren ist jedoch der Fall der direkten Bindung von Nukleinsäuren an Glas bevorzugt, unter anderem deshalb, weil sich eine Modifizierung der Nukleinsäuren erübrigt und schon native Nukleinsäuren gebunden werden können. Die Bindung nativer Nukleinsäuren an Glaspartikel kann analog zu Verfahren des Standes der Technik erfolgen. Bevorzugt erfolgt sie in Gegenwart chaotroper Salze, wobei die Konzentration dieser Salze zwischen 2 und 8 mol/l beträgt, bevorzugt 4 bis 6 mol/l. Bei chaotropen Salzen handelt es sich z. B. um Natriumjodid, Natriumperchlorat, Guanidiniumthiocyanat, Guanidiniumisothiocyanat oder Guanidiniumhydrochlorid, ist jedoch nicht auf diese Verbindungen beschränkt.

Zum Inkontaktbringen der Probe mit den Partikeln wird die Probe mit den Partikeln vermischt und für eine für die Bindung ausreichende Zeit inkubiert. Die Länge der Inkubation ist dem Fachmann in der Regel aus der Behandlung mit nicht-magnetischen Partikeln bekannt, eine Optimierung ist durch Durchführung einer Bestimmung der Menge an immobilisiertem biologischem Material an der Oberfläche zu verschiedenen Zeitpunkten möglich. Für Nukleinsäuren können Inkubationszeiten zwischen 10 Sekunden und 30 Minuten zweckmäßig sein.

Je nach Größe und Art der magnetischen Partikel findet schon während der Inkubationszeit eine Separation der Partikel von der Flüssigkeit statt oder erhält sich die Suspension über längere Zeit. Wenn die Partikel eine sehr kleine Korngröße aufweisen und superparamagnetisch sind, erhält sich die Suspension über einen längeren Zeitraum. Handelt es sich um Partikel mit einer größeren Korngröße, so findet bereits während der Inkubation eine langsame Separation der Partikel von der Flüssigkeit statt. Insbesondere wenn es sich um ferromagnetische Partikel handelt, bilden sich solche Aggregate. Für den bevorzugten Fall, daß die ferromagnetischen Partikel nicht vormagnetisiert sind, ist eine besonders schonende Separation gewährleistet.

Die Immobilisierung findet bevorzugt nicht durch Ausfällung durch Erniedrigung der Löslichkeit der zu immobilisierten Materialien statt. Stattdessen beruht die Immobilisierung auf

biospezifischen Wechselwirkungen (Fang-Moleküle) oder Adsorption. Dies vermeidet weitgehend unspezifische Einschlüsse von Verunreinigungen.

Nach der Inkubation erfolgt die Abtrennung des biologischen Materials von der Flüssigkeit. Dies wird allgemein durch die Separation des an die magnetischen Partikel gebundenen Materials mit Hilfe eines Magnetfeldes erreicht. Beispielsweise können die Magnetpartikel an die Wand des Gefäßes, in welchem die Inkubation stattgefunden hatte, gezogen werden. Daraufhin kann die Flüssigkeit mit den Inhaltsstoffen der Probe, die nicht an die magnetischen Partikel gebunden wurden, entfernt werden. Diese Entfernung hängt von der Art des Gefäßes ab, in dem die Inkubation stattgefunden hat. Geeignete Verfahrensschritte sind Abpipettieren oder Absaugen der Flüssigkeit.

Danach können die magnetischen Partikel gewünschtenfalls ein- oder mehrfach mit einer Waschlösung gereinigt werden. Die Waschlösung wird so gewählt, daß eine Ablösung des biologischen Materials von der Partikeloberfläche möglichst nicht stattfindet, jedoch nicht zu isolierende Verunreinigungen möglichst gut gewegewaschen werden. Dieser Waschschrift findet bevorzugt durch Inkubation der Waschlösung mit den Partikeln statt, wobei bevorzugt eine Resuspension der Partikel vorgenommen wird, z. B. durch Schütteln oder Anlegung eines nicht mit dem ersten Magnetfeld identischen Magnetfeldes. Die verunreinigte Waschlösung wird bevorzugt genauso entfernt wie die Probe in dem oben genannten Schritt zur Bindung des biologischen Materials.

Im Anschluß an den letzten Waschschrift kann ein kurzer Trocknungsschritt der magnetischen Partikel im Vakuum oder durch Ausdampfen (lassen) der Flüssigkeit vorgenommen werden, wobei auch eine Vorbehandlung mit Aceton möglich ist.

Das so gereinigte biologische Material kann, falls gewünscht, von den magnetischen Partikeln entfernt werden. Auch dieser Schritt richtet sich nach der Art der Bindung des biologischen Materials an die magnetischen Partikel. Für den Fall, daß es sich bei dem biologischen Material um native Nukleinsäuren und bei den magnetischen Partikeln um glasüberzogene Partikel handelt, kann die Nukleinsäure mittels eines Elutionspuffers mit niedrigem Salzgehalt von den erfindungsgemäßen Partikeln entfernt werden. Solche Puffer sind aus DE 3724442 und Analytical Biochemistry 175, 196-201 (1988) bekannt. Als Elutionspuffer mit niedrigem Salzgehalt werden insbesondere Puffer mit einem Gehalt von weniger als 0,2 mol/l eingesetzt. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform enthält der

Elutionspuffer Tris. In einer anderen besonderen Ausführungsform handelt es sich bei dem Elutionspuffer um entmineralisiertes Wasser.

In einer weiteren Ausführungsform kann das beschriebene Reinigungs- und Isolierungsverfahren im Anschluß an eine immunomagnetische Separation von Zellen (z. B. virale Partikel oder prokaryontische bzw. eukaryontische Zellen) aus einer Körperflüssigkeit oder einem Gewebe erfolgen. Hierzu wird die Probe mit magnetischen Partikeln, an welche ein Antikörper gegen ein Antigen auf der Zelle immobilisiert ist, z. B. unter Schütteln inkubiert. Solche Partikel können erfindungsgemäße Partikel sein, aber auch käufliche (z. B. MACS Microbeads der Firma Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, BRD). Nach Anlegen eines Magnetfeldes erfolgen ein oder mehrere Waschschrte mit einer salzhaltigen Waschlösung. Man erhält Partikel, an welche die gewünschten Zellen gebunden sind. Schließlich werden die gebundenen Zellen in einem salzhaltigen Puffer resuspendiert. In einer bevorzugten Ausführungsform ist dieser salzhaltige Puffer eine chaotrope Salzlösung, so daß die in der Zelle vorhandenen Nukleinsäuren aus den Zellen freigesetzt werden.

Durch Kombination der oben beschriebenen Isolierung von Zellen mit der ebenfalls beschriebenen Isolierung von Nukleinsäuren, bevorzugt in ihrer nativen Form, an den erfindungsgemäßen magnetischen Partikeln, ergibt sich ein besonders vorteilhaftes Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren aus zellhaltigen Proben. Vorteil dieser Ausführungsform ist die mögliche Einfachheit (Single-Tube-Methode), hohe Sensitivität (besonders wichtig in der medizinischen Mikrobiologie und Onkologie) und die leichte Automatisierbarkeit.

Die als Folge der erfindungsgemäßen Verfahren isolierten biologischen Materialien können nun in beliebiger Weise weiter verwendet werden. Beispielsweise können sie als Substrat für verschiedene enzymatische Reaktionen verwendet werden. Im Falle der Nukleinsäuren seien als Beispiel die Sequenzierung, die radioaktive oder nicht-radioaktive Markierung, die Amplifikation einer oder mehrerer in ihr enthaltender Sequenzen, die Transkription, die Hybridisierung mit markierten Sondennukleinsäuren, die Translation oder die Ligation genannt. Ein Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist, daß die Abtrennung des biologischen Materials von der Flüssigkeit sehr einfach ist. Im Stand der Technik wurde zur Separierung von Glaspartikeln von Verunreinigungen entweder ein Zentrifugationsschritt angewandt, oder im Falle der Bindung des biologischen Materials an Glasfaserfilter die Flüssigkeit durch diese Flüssigkeit gesaugt. Hierbei handelt es sich um einen limitierenden Schritt, der die Verarbeitung von großen Probenzahlen behindert.

Mit den erfindungsgemäßen Partikeln ist eine effektivere Abtrennung der biologischen Materialien von Verunreinigungen möglich. Insbesondere können Inhibitoren für bestimmte enzymatische Reaktionen erfindungsgemäß in besonders gutem Umfang entfernt werden. Die Ausbeute an biologischem Material ist vergleichsweise hoch. Eine Fraktionierung langer Nukleinsäuren wurde nicht beobachtet. Die erfindungsgemäßen Partikel sind bevorzugt schneller magnetisierbar.

In Figur 1 ist schematisch eine Isolierung von Nukleinsäuren aus einer zellhaltigen Probe gezeigt.

In Figur 2 ist die Auftrennung erfindungsgemäß isolierter Nukleinsäuren in einem Agarosegel gezeigt.

In Figur 3 ist die Auftrennung von Reaktionsprodukten nach erfindungsgemäßer Isolierung und PCR-Amplifikation dargestellt.

In Figur 4 ist ein Gel der Ergebnisse aus Beispiel 4 gezeigt.

In Figur 1 ist eine Isolierung von Nukleinsäuren aus einer zellhaltigen Probe schematisch dargestellt. Die Probe (Specimen), welche Zellen enthält, wird probenspezifisch so vorbereitet, daß die Zellen, in denen die Nukleinsäuren nachgewiesen werden sollen, in geeigneter Form vorliegen. Hierzu gehört z. B. bei Proben, welchen Körperflüssigkeiten entnommen wurden, die Zugabe von Reagenzien, z. B. zur Verflüssigung von zähflüssigen Proben, z. B. Speichelproben. Der so vorbereiteten Probe wird in einem Gefäß ein an eine Festphase, bevorzugt an eine Perle (Bead) gebundener Antikörper zugegeben, welcher die Zelle erkennen und binden kann. Als geeignete Partner für den Antikörper haben sich beispielsweise Antigene auf der Zelloberfläche erwiesen. Die Spezifität des Antikörpers kann sich nach der Spezifität der zu lösenden Analyseaufgabe richten. Wenn es sich bei der Festphase um die Wand des Gefäßes handelt, werden die Zellen direkt an die Wand gebunden. Für den Fall, daß es sich bei den Festphasen um eine Perle handelt, werden diese durch geeignete Separationsmethoden von der Flüssigkeit separiert. Dies kann beispielsweise durch Filtration geschehen. Im Falle von magnetischen Perlen ist eine Abtrennung durch Anlegen eines Magnetfeldes an die Außenwand des Gefäßes möglich. Die separierten Zellen werden mit einer Flüssigkeit gewaschen, um Verunreinigungen, welche den Nachweis stören würden, mit dem die Zellen umgebenden Medium zu entfernen. Bevorzugt werden Bedingungen eingesetzt, bei denen die Zellen weder von der Festphase gelöst noch zerstört wer-

den. Anschließend findet die Zerstörung der Zellen statt, die sogenannte Lyse. Eine Möglichkeit ist durch die Behandlung der Zellen mit chaotropen Salzen gegeben. Andere Möglichkeiten sind die Einwirkung von Proteinasen und Detergenzien.

Zu der Lysemischung werden in der bevorzugten Ausführungsform die erfindungsgemäßen Partikel zugegeben. Nach einer geeigneten Einwirkungszeit, die über die Beladung der Oberfläche mit Nukleinsäuren optimiert werden kann, werden die Partikel von der sie umgebenden Flüssigkeit, die weitere und nicht nachzuweisende Zellbestandteile enthält, getrennt. Dies geschieht wiederum bevorzugt durch Anlegen eines magnetischen Feldes mittels eines Magneten an der Gefäßwand.

Um eventuell noch anhaftende Verunreinigungen zu entfernen, wird bevorzugt mit einer Flüssigkeit gewaschen, die so ausgewählt wird, daß die zu bestimmenden Nukleinsäuren sich nicht von der Glasoberfläche ablösen. Zur Entfernung der Nukleinsäuren von der Glasoberfläche wird ein sogenannter Elutionspuffer zugegeben, der Reagenzbedingungen aufweist, unter denen sich die Nukleinsäuren von der Glasoberfläche lösen. Dies sind insbesondere Niedrigsalzbedingungen. Je nach beabsichtigter Weiterbehandlung der Nukleinsäuren kann die Flüssigkeit nun von den Partikeln getrennt und weiterbearbeitet werden. Es ist bevorzugt, diese Abtrennung bei anliegendem Magnetfeld vorzunehmen, so daß die Partikel separiert vorliegen.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung näher.

Beispiel 1Herstellung der erfindungsgemäßen magnetischen Partikel

Es wurden 6 verschiedene Sole verwendet. Die Herstellung der Sole wurde nach folgenden Schemata durchgeführt:

Sol 1 ($\text{SiO}_2:\text{B}_2\text{O}_3 = 7:3$):

Die Synthese wurde in einem 250 ml Rundkolben unter ständigem Rühren durchgeführt.

86,6 ml Tetraethylorthosilicat

+ 7 ml wasserfreies unvergälltes Ethanol

+ 14,1 ml 0,15 M HCl

Es entsteht ein zweiphasiges Gemisch, welches bei Raumtemperatur solange gerührt wird, bis es einphasig wird. Danach erfolgt tropfenweise die Zugabe von

+ 37,8 ml Trimethylborat.

Anschließend wird das Sol 2 Stunden bei 50 °C gehalten. Danach erfolgt die Zugabe von

+ 14,1 ml 0,15 M HCl

Sol 2 ($\text{SiO}_2:\text{B}_2\text{O}_3 = 4:1$):

Die Synthese wurde in einem 250 ml Rundkolben unter ständigem Rühren durchgeführt.

100,5 ml Tetraethylorthosilicat

+ 7 ml wasserfreies unvergälltes Ethanol

+ 16,3 ml 0,15 M HCl

Es entsteht ein zweiphasiges Gemisch, welches bei Raumtemperatur solange gerührt wird, bis es einphasig wird. Danach erfolgt tropfenweise die Zugabe von + 25,6 ml Trimethylborat.

Anschließend wird das Sol 2 Stunden bei 50 °C gehalten. Danach erfolgt die Zugabe von

+ 16,3 ml 0,15 M HCl

Sol 3 ($\text{SiO}_2:\text{B}_2\text{O}_3 = 85:15$):

Die Synthese wurde in einem 250 ml Rundkolben unter ständigem Rühren durchgeführt.

107,8 ml Tetraethylorthosilicat

+ 7 ml wasserfreies unvergälltes Ethanol

+ 17,5 ml 0,15 M HCl

- 15 -

Es entsteht ein zweiphasiges Gemisch, welches bei Raumtemperatur solange gerührt wird, bis es einphasig wird. Danach erfolgt tropfenweise die Zugabe von + 19,4 ml Trimethylborat.

Anschließend wird das Sol 2 Stunden bei 50 °C gehalten. Danach erfolgt die Zugabe von + 17,5 ml 0,15 M HCl

Sol 4 ($\text{SiO}_2:\text{B}_2\text{O}_3 = 4:1$; 2 Mol% P_2O_5):

Die Synthese wurde in einem 250 ml Rundkolben unter ständigem Rühren durchgeführt.

100,5 ml Tetraethylorthosilicat

+ 7 ml wasserfreies unvergälltes Ethanol

+ 16,3 ml 0,15 M HCl

Es entsteht ein zweiphasiges Gemisch, welches bei Raumtemperatur solange gerührt wird, bis es einphasig wird. Danach erfolgt tropfenweise die Zugabe von

+ 25,6 ml Trimethylborat

Anschließend wird das Sol 2 Stunden bei 50 °C gehalten. Danach erfolgt die Zugabe von

+ 16,3 ml 0,15 M HCl

+ 1,63 g P_2O_5

Sol 5 ($\text{SiO}_2:\text{B}_2\text{O}_3 = 4:1$ Mol% Al_2O_3):

Die Synthese wurde in einem 250 ml Rundkolben unter ständigem Rühren durchgeführt.

100,5 ml Tetraethylorthosilicat

+ 7 ml wasserfreies unvergälltes Ethanol

+ 16,3 ml 0,15 M HCl

Es entsteht ein zweiphasiges Gemisch, welches bei Raumtemperatur solange gerührt wird, bis es einphasig wird. Danach erfolgt tropfenweise die Zugabe von

+ 25,6 ml Trimethylborat.

Anschließend wird das Sol 2 Stunden bei 50 °C gehalten. Danach erfolgt die Zugabe von

+ 16,3 ml 0,15 M HCl

+ 3,06 g AlCl_3

Sol 6 ($\text{SiO}_2:\text{B}_2\text{O}_3 = 4:1$ Mol% ZrO_2):

Die Synthese wurde in einem 250 ml Rundkolben unter ständigem Rühren durchgeführt.

100,5 ml Tetraethylorthosilicat

- 16 -

- + 7 ml wasserfreies unvergälltes Ethanol
- + 16,3 ml 0,15 M HCl

Es entsteht ein zweiphasiges Gemisch, welches bei Raumtemperatur solange gerührt wird, bis es einphasig wird. Danach erfolgt tropfenweise die Zugabe von

- + 25,6 ml Trimethylborat

- + 5,15 ml Zirkon(IV)-proylat, 70 Gew.% Lsg in 1-Propanol

Anschließend wird das Sol 2 Stunden bei 50 °C gehalten. Danach erfolgt die Zugabe von

- + 16,3 ml 0,15 M HCl

Nach weiteren 2 Stunden bei 50 °C wurde in jeweils 150 ml der Sole 22,5 g Iridin 600 (Black Mica) eingerührt und anschließend mit einem Sprühtrockner (Büchi 190, Mini Spray Dryer) beschichtet. Die Düsentemperatur des Sprühtrockners betrug 134 °C.

Das durch den Sprühtrockenprozeß erhaltene Pulver wurde anschließend einer Temperaturbehandlung unter Stickstoffatmosphäre (90 l/h) unterzogen. Die Aufheizgeschwindigkeit betrug hierbei 1 k/min und die Haltezeit betrug 2 Stunden bei der Verdichtungstemperatur. Diese Temperatur lag bei der Beschichtung mit Sol 1 bei 750 °C, bei der Beschichtung mit Sol 2 bei 860 °C und bei den übrigen Beschichtungen bei 800 °C. Nach dem Sinterprozeß wurde der Ofen abgeschaltet und das Pulver auf Raumtemperatur abgekühlt. Eventuell entstandene Agglomerate wurden mit einem 50 µm Sieb ausgesiebt.

Beispiel 2

Herstellung von GMP1, GMP2, GMP3 und GMP4

GMP1, GMP2, GMP3 und GMP4 sind Pigmente aus unterschiedlichen Herstellungs-Chargen, die aus Sol 1 aus Beispiel 1 in einem Prozeß nach Beispiel 1 unter folgenden Bedingungen erhalten wurden:

Parameter	GMP 1	GMP 2	GMP 3	GMP 4
Alterung des Sols (h) (30°C)	36	36	36	36
Pigmentanteil des Sols (g/100 ml)	5	15	8	20
Luftstrom der Düse (%)	100	100	100	100
Luftdruck (bar)	6	6	6	3
Düsentemperatur (°C)	135	120	130	143
Verdichtungstemperatur (°C)	534	534	534	615
O ₂ -Nachbehandlung (1 Stunde)	(300°C)	(300°C)	300°C)	(400°C)
Ausbeute an Pigment	niedrig	hoch	mittel	hoch
DNA-Ausbeute	niedrig	hoch	hoch	hoch

Beispiel 3

PCR Probenvorbereitung aus humanen Vollblut mit magnetischen Glaspartikeln

Isolierung der Nukleinsäure

Von drei Glasmagnetpartikel-Chargen (GMP2 - 4) wurden je ca. 10 mg in Eppendorf Reaktionsgefäßen vorgelegt. Die genauen Einwaagen sind in Tabelle 1 angegeben, es wurden Dreifach-Bestimmungen durchgeführt.

Zu je 200 µl aufgetautem Vollblut wurden 40 µl Proteinase K (20 mg/ml, hergestellt aus Lyophilisat) pipetiert und sofort gemischt. Anschließend wurden 200 µl Bindepuffer (6 M Guanidin-HCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM Harnstoff, 30 % Triton X-100, pH 4,4) zugegeben, gemischt und für 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl i-Propanol wurde für 10 Sekunden auf dem Vortex-Mischer gemischt, die Probe für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und abermals für 10 Sekunden wie vor gemischt. Die Magnetseparation erfolgte für wenigstens 30 Sekunden im Magnetpartikelseparator von Boehringer Mannheim (Id.-Nr. 1 641 794). Der Überstand wurde abgenommen und wie weiter unten beschrieben analysiert.

Die Magnetpartikel wurden mit jeweils 500 µl Wasch-Puffer (20 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 (25°C), 80 % Ethanol) durch 10 Sekunden mischen, 1 Minute Inkubation bei Raumtemperatur und 10 Sekunden mischen gewaschen und mit dem Magnetpartikelseparator an die Gefäßwand gezogen. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Die Waschprozedur wurde wiederholt bis der Waschüberstand farblos war (insgesamt 4 x Waschen). Nun wurden die Nukleinsäuren 3 x mit jeweils 200 µl auf 70°C vorgewärmten Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) durch 10 Sekunden mischen, 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur und 10 Minuten mischen eluiert.

Aufarbeitung des Überstandes

Der Überstand nach der 1. Bindung an die magnetischen Glaspartikel wurde folgendermaßen auf Gehalt an Nukleinsäuren überprüft: Der Überstand wurde in ein Filter-Tube (Boehringer Mannheim, Id.-Nr. 1744003, z.B. enthalten in *High Pure* PCR Product Purification Kit) gegeben und für 1 Minute bei 8000 rpm in einer Eppendorf Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Durchlauf wird verworfen und das Filter-Tube 2 x mit 500 µl Wasch-Puffer gewaschen (Zentrifugation wie vor). Das Filter-Tube wird kurz trocken zentrifugiert und dann mit 2 x 200 µl auf 70°C vorgewärmten 1 x Elutionspuffer durch erneute Zentrifugation eluiert.

Analyse der Eluate und des Probenüberstandes

50 µl der Eluate bzw. der über Filter-Tube aufgearbeiteten Überstände wurden mit 10 µl Proben-Puffer versetzt und davon 45 µl in einem 0,8 %igen Agarosegel elektrophoretisch bei 120 V für 90 Minuten aufgetrennt.

Verschieden Verdünnungen der Eluate bzw. der aufgearbeiteten Überstände wurden bei 260 und 280 nm in einem Uvikon 710 (Kontron) spektroskopisch vermessen.

- 19 -

Zwei 5 µl Aliquots der Eluate wurden als Doppelbestimmung durch Expand™ Long Template PCR (Boehringer Mannheim, Id.-Nr. 1681834) mit spezifischen Primern für das menschliche tPA-Gen (erwartete Produktlänge 15 kb) überprüft.

Mix I	pro Ansatz	Mix II	pro Ansatz
dNTP, je 100 mM	1 µl	Expand™ Puffer, 10 x	5 µl
Primer 1, 200 ng/µl	1 µl	Expand™ Polymerase	0,75 µl
Primer 2, 225 ng/µl	1 µl	H ₂ O, bidest.	19,25 µl
H ₂ O, bidest.	17 µl		
	20 µl		25 µl

Mix I wird in ein dünnwandiges PCR-Tube vorgelegt mit 5 µl Eluat versetzt und Mix II zugegeben. Der Ansatz wird kurz gemischt und mit 30 µl Mineralöl überschichtet. Die Ansätze werden in einem Perkin-Elmer Thermocycler 9600 mit folgenden Programm amplifiziert:

2 Minuten	92°C	
10 Sekunden	92°C	
30 Sekunden	65°C	
12 Minuten	68°C	10 Zyklen
10 Sekunden	92°C	
30 Sekunden	65°C	
12 Minuten +	68°C	20 Zyklen
20 Sekunden pro Zyklus		
7 Minuten	68°C	
anschließend	7°C	

Die 50 µl PCR Ansätze wurden mit 10 µl Proben-Puffer versetzt und davon 45 µl in einem 0,8 %igen Agarosegel elektrophoretisch bei 120 V für 90 Minuten aufgetrennt.

Ergebnisse

Überstand 1:8					1. Eluat 1:8				
		260 nm	280 nm	Aus-beute	260/28	260 nm	280 nm	Aus-beute	260/28
GMP/2	12 mg	1	0,021	0,013	1,7 µg	1,6	0,171	0,164	13,7 µg
	10 mg	2	0,045	0,035	3,7 µg	1,3	0,137	0,138	11,0 µg
	9 mg	3	0,036	0,027	2,9 µg	1,3	0,153	0,164	12,2 µg
GMP/3	10 mg	1	0,050	0,042	4,0 µg	1,2	0,245	0,246	19,6 µg
	10 mg	2	0,033	0,022	2,6 µg	1,5	0,397	0,398	31,8 µg
	10 mg	3	0,042	0,030	3,4 µg	1,4	0,278	0,282	22,2 µg
GMP/4	10 mg	1	0,065	0,056	0,7 µg	1,2	0,135	0,142	11,0 µg
	11 mg	2	0,071	0,142	2,4 µg	0,5	0,140	0,142	11,2 µg
	10 mg	3	0,066	0,051	1,7 µg	1,3	0,130	0,130	10,4 µg

2. Eluat 1:8					3. Eluat 1:4				
		260 nm	280 nm	Aus-beute	260/28	260 nm	280 nm	Aus-beute	260/28
GMP/2	1	0,099	0,101	7,9 µg	1,0	0,057	0,062	2,3 µg	0,9
	2	0,078	0,076	6,2 µg	1,0	0,041	0,049	1,6 µg	0,8
	3	0,103	0,112	8,2 µg	0,9	fehlt			
GMP/3	1	0,147	0,147	11,8 µg	1,0	0,084	0,098	3,4 µg	0,9
	2	0,256	0,252	20,5 µg	1,0	0,042	0,043	1,7 µg	1,0
	3	0,147	0,143	11,8 µg	1,0	0,073	0,093	2,9 µg	0,8
GMP/4	1	0,106	0,108	8,5 µg	1,0	0,083	0,098	3,3 µg	0,8
	2	0,111	0,114	8,9 µg	1,0	0,054	0,063	2,2 µg	0,9
	3	0,135	0,141	10,8 µg	1,0	0,077	0,095	3,1 µg	0,8

Tabelle 1: Ausbeute an Nukleinsäuren mit magnetischen Glasparkeln aus 200 µl Blut

Die 1. Eluate waren noch leicht gelb gefärbt und teilweise mit feinen Magnetpartikeln kontaminiert.

Die Analyse der Eluate im Agarosegel (FIG. 2) zeigt eine gute Reproduzierbarkeit der Ausbeute. Die Magnetpartikel GMP/2 - 4 zeigen keine signifikanten Unterschiede. In den Eluat 1 (oben) und 2 (unten) ist etwa die gleiche Nukleinsäurekonzentration vorzufinden (vom Gel geschätzt). Eluat 3 zeigt nur noch eine geringe Nukleinsäurekonzentration. In den Überständen ist ebenfalls nur eine geringe Nukleinsäurekonzentration zu beobachten.

Die Expand™ PCR liefert mit allen Proben, bis auf wenige Ausreißer (Tabelle 2), durchweg gute und spezifische Amplifikationsprodukte. Mit den magnetischen Glasbeads ließen sich aus humanen Blutproben Nukleinsäuren isolieren, die in einer anschließenden PCR spezifische Amplifikate lieferten.

15 kb Expand™ PCR			humanes tPA Gen		
1. Eluat			2. Eluat		
GMP/2	1	fehlt		+	+
	2	+	+	+	+
	3	+	+	fehlt	
GMP/3	1	+	+	+	+
	2	(+)	+	+	+
	3	-	(+)	+	+
GMP/4	1	+	+	+	+
	2	+	+	+	(+)*
	3	+	+	fehlt	
K, BM Kontroll DNA					

Tabelle 2. Ergebnisse Expand™ PCR

* 3. Eluat

In FIG. 3 ist ein Gel mit den Reaktionsprodukten nach PCR-Amplifikation gezeigt. MWM III ist ein Molekulargewichtsmarker (Eluat 1, oben; Eluat 2, unten).

Beispiel 4

Bindung von DNA-Längenstandard an magnetische Glaspartikel

1. Vorbereitung der magnetischen Glaspartikel

Von der Glasmagnetcharge GMP4 wurden 12 mg in Eppendorf-Reaktionsgefäße vorgelegt.

2. Lyse und Bindung

In einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß mit 12 mg magnetischen Glaspartikeln werden 900 µl Lysis-Puffer (4.6 M GuSCN, 45 mM Tris, 20 mM EDTA, pH 7,3) und 100 µl DNA-Probe, in der modellhaft DNA-Längenstandard III von Boehringer Mannheim (Katalog-Nr. 528552) eingesetzt wurde, 2 bis 10 sec. gemischt, bis eine homogene Suspension entsteht. Die Lösung wird 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, wobei alle 5 min gemischt wird.

Die Magnetseparation erfolgt für mindestens 15 sec in einem Magnetpartikelseparator. Der Überstand wird abpipettiert.

3. Waschen und Trocknen

Die magnetischen Glaspartikel werden zweimal mit Waschpuffer (5.2 M GuSCN, 50 mM Tris, pH 6.5) zweimal mit 70% vorgekühltem Ethanol und einmal mit Aceton gewaschen, indem das Magnetfeld entfernt, 800 µl Lösung zupipettiert, 2 sec gemischt, 1 min bei RT inkubiert, das Magnetfeld angelegt und der Überstand schließlich abpipettiert wird.

Nach Entfernung des Acetons werden die Partikel 10 min bei 56 °C im Heizblock bei offenem Deckel getrocknet.

4. Elution der DNA

Die DNA wird mit 4x 50µl Elutionspuffer (10mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) eluiert, indem 10 min unter mehrmaligem Schütteln bei 56°C inkubiert wird und der DNA-haltige Überstand schließlich in ein neues Eppendorf-Gefäß transferiert wird.

5. Analyse der Eluate

Ein Fünftel des Eluatvolumens wurde mit Probenpuffer versetzt und die DNA auf einem 1 %igen Agarosegel bei 90 V aufgetrennt. Zur Bestimmung der Recovery wurde eine Verdünnungsreihe von DNA-Längenstandard III auf das gleiche Gel aufgetragen, die die in den Proben zu erwartenden DNA-Mengen enthält.

Die quantitative Auswertung erfolgte durch Scannen eines Polaroidphotos des Agarosegels. Hierbei wurde die Verdünnungsreihe des Standards als Kalibrator verwendet.

Die Ausbeute an DNA mit magnetischen Glaspartikeln ist in Tabelle 1 dargestellt

Standar Nr.	DNA - Menge im Stan- dard [ng]	Helligkeitsintens. Standard (Meßwert) [rel. Einheiten]	Probe Nr	Pigment/ Bead-Typ	Helligkeitsintens. Probe (Meßwert) [rel. Einheiten]	errechnete DNA- Menge auf Gel [ng]	errechnete DNA- Menge in Probe [ng]	Recovery [%]
1	200	65	1	GMP4	45	139	695	69,5
2	175	56	2	GMP4	39	120	600	60,0
3	150	51						
4	125	44						
5	100	37						
6	75	25						
7	50	17						
8	25	9						
9	10	4						

Tabelle1. Ausbeute an DNA-Längenstandard III mit magnetischen Glaspartikeln

Das Agarosegel, das als Grundlage für die quantitative Auswertung diente, ist in FIG. 4 dargestellt. Es handelt sich um ein 1%iges Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel. Spur 1 bis 10 entspricht einer Verdünnungsreihe von DNA-Längenstandard III. 1: 1 µg DNA, 2: 200 ng DNA, 3: 175 ng DNA, 4: 150 ng DNA, 5: 125 ng DNA, 6: 100 ng DNA, 7: 75 ng DNA, 8: 50 ng NDA, 9: 25 ng DNA, 10: 10 ng DNA.

Spur 11 und 12 entspricht der von den magnetischen Glaspartikeln eluierten DNA bei Einsatz von 200 ng DNA-Längenstandard.

- 24 -

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Boehringer Mannheim GmbH
- (B) STRASSE: Sandhoferstr. 116
- (C) ORT: Mannheim
- (E) LAND: DE
- (F) POSTLEITZAHL: 68298
- (G) TELEFON: 0621 759 4348
- (H) TELEFAX: 0621 759 4457

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Magnetisches Pigment

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 34 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligodeoxyribonukleotid"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

- 25 -

ACTGTGCTTC TTGACCCATG GCAGAAGCGC CTTC

34

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 34 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligodeoxyribonukleotid"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

CCTTCACTGT CTGCCTAACT CCTTCGTGTG TTCC

34

Patentansprüche

1. Magnetische Partikel mit einer äußeren Glasoberfläche, die im wesentlichen porenfrei ist oder Poren eines Durchmessers von weniger als 10 nm aufweist.
2. Ferromagnetische Partikel mit einer Glasoberfläche.
3. Partikel gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Korngröße von zwischen 10 und 60 µm haben.
4. Partikel gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß eventuell in der Oberfläche vorhandene Poren einen Durchmesser von weniger als 1 nm haben.
5. Partikel gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Partikel einen Verbundstoff aus einem Kern aus Glimmer und darauf immobilisierten Magnetitpartikeln enthalten, wobei dieser Verbundstoff von einer Glasschicht umschlossen ist.
6. Verfahren zur Isolierung eines biologischen Materials durch
 - Inkontaktbringen einer Probe, die das biologische Material in einer Flüssigkeit enthält, mit Partikeln gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 unter Bedingungen, bei denen das biologische Material an die Partikeloberfläche bindet, und
 - Abtrennung des biologischen Materials von der Flüssigkeit.
7. Verfahren gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem biologischen Material um Nukleinsäuren handelt.
8. Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren durch
 - Inkontaktbringen einer Probe, welche die Nukleinsäure in nativer Form in einer Flüssigkeit enthält, mit magnetischen Partikeln mit Glasoberflächen unter Bedingungen, bei denen die Nukleinsäuren in nativer Form an die Glasoberfläche binden können und
 - Abtrennung der gebundenen Nukleinsäuren von der Flüssigkeit.

9. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 6 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Abtrennung mit Hilfe eines Magneten geschieht.
10. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 6 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die magnetischen Partikel beim Inkontaktbringen mit der Probe nicht vormagnetisiert sind.
11. Verfahren zur Herstellung magnetischer Glaspartikel durch
 - Bereitstellung eines magnetischen Kernes und
 - Umschließen des magnetischen Kernes mit einer im wesentlichen porenfreien Glasoberfläche.
12. Verfahren gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß das Umschließen die Abscheidung eines Sols auf der Oberfläche und das anschließende Verdichten des Sols beinhaltet.
13. Verwendung ferromagnetischer Glaspartikel zur Isolierung von Nukleinsäuren in nativer Form.

FIG 1

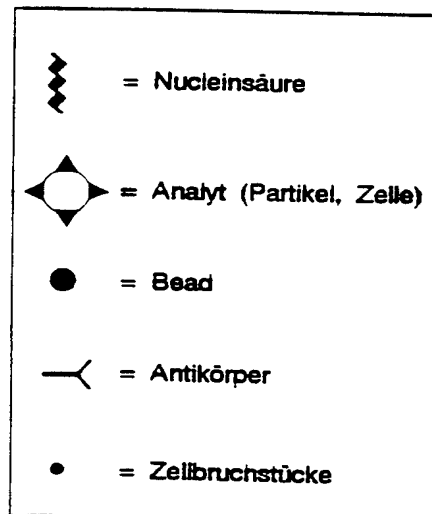
Specimen

Zugabe von
Bead-AK-KomplexImmunomagn.
Separation

Waschen

Lysis der Zellen
mit chaotropen SalzenZugabe von
magn. GlaspartikelnMagnet. Separation von
NA-Glaspartikel-KomplexWaschen
Zugabe von Elutionspuffer

Elution von NAs

Specimen-Spezif.
Vorbehandlung

2/3

1 μ g λ DNA V38/2 V38/3 V38/4

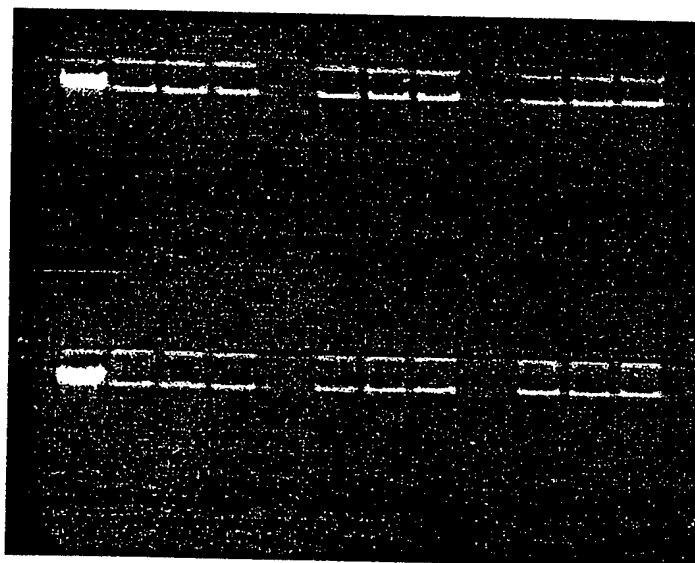
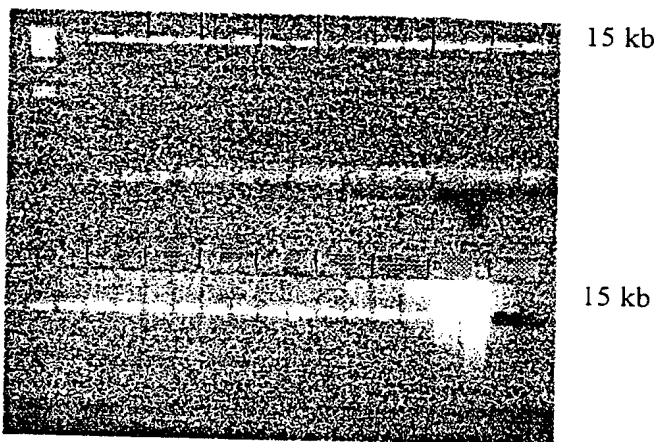


FIG 2

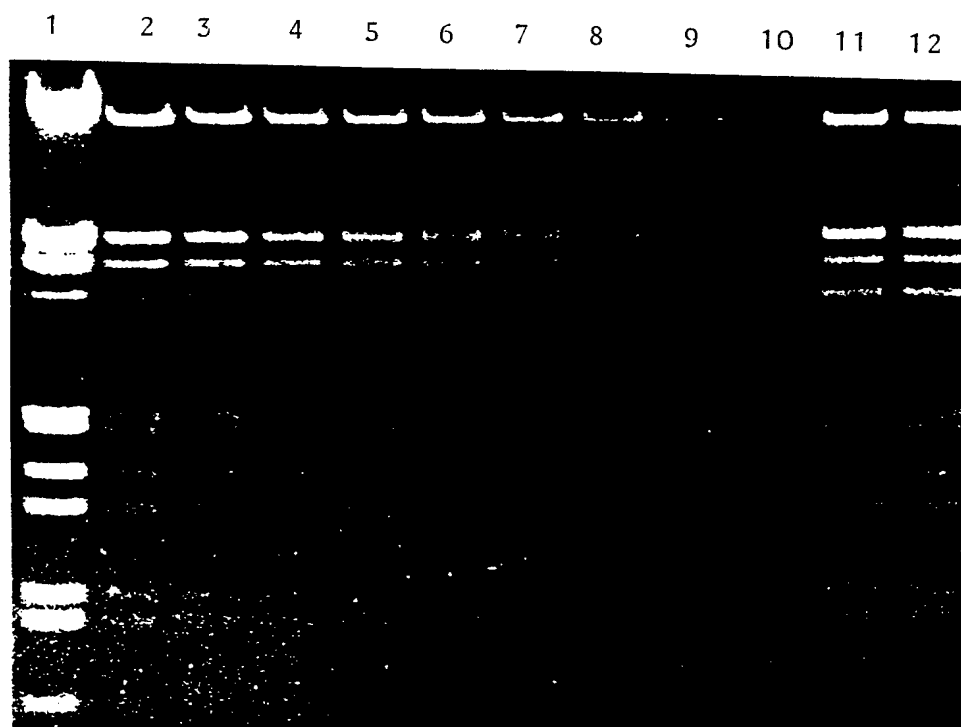
MWM III V38/2 | V38/3 | V38/4
 2 3 1 2 3 1 2 3



1 2 | 1 2 3 | 1 2 K
 V38/2 | V38/3 | V38/4

FIG 3

FIG 4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 96/02459

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07H21/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP,A,0 343 934 (ALCAN INT LTD) 29 November 1989 see the whole document ---	1-7,9-13
X	DE,A,43 07 262 (BERGEMANN CHRISTIAN) 8 September 1994 see the whole document ---	1-7,9-13
X	GB,A,2 116 206 (KMS FUSION INC) 21 September 1983 see the whole document ---	1-5,11
Y	WO,A,88 06633 (ARNOLD LYLE JOHN JR ;NELSON NORMAN CHARLES (US); REYNOLDS MARK ALA) 7 September 1988 see page 18, line 21 - line 27; examples 1,2 --- -/--	1-13

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

* & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 October 1996

Date of mailing of the international search report

05. 11. 96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Bardili, W

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter nal Application No
PCT/EP 96/02459

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US,A,4 554 088 (WHITEHEAD ROY A ET AL) 19 November 1985 see the whole document ---	1-13
Y	ANAL. BIOCHEM., vol. 175, 1988, pages 196-201, XP002015369 W. PYERIN ET AL.: "Filter-Supported Preparation of Phage DNA" cited in the application see the whole document ---	1-13
Y	NUCLEIC ACIDS RES., vol. 22, 1994, pages 4543-4, XP002015370 T.L. HAWKINS ET AL.: "DNA Purification and Isolation Using a Solid-Phase" see the whole document -----	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inter. nal Application No

PCT/EP 96/02459

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0343934	29-11-89	AT-T- 117829	15-02-95
		DE-D- 68920778	09-03-95
		DE-T- 68920778	18-05-95
		ES-T- 2066851	16-03-95
		JP-A- 2038318	07-02-90
		US-A- 5039559	13-08-91
DE-A-4307262	08-09-94	NONE	
GB-A-2116206	21-09-83	US-A- 4448884	15-05-84
		CA-A- 1191096	30-07-85
		FR-A- 2522678	09-09-83
		JP-C- 1306775	13-03-86
		JP-A- 58165787	30-09-83
		JP-B- 60030510	17-07-85
		SE-B- 455310	04-07-88
		SE-A- 8301015	04-09-83
WO-A-8806633	07-09-88	AT-T- 107654	15-07-94
		AU-A- 1426988	26-09-88
		DE-D- 3850273	28-07-94
		DE-T- 3850273	29-09-94
		EP-A- 0281390	07-09-88
		ES-T- 2054797	16-08-94
		JP-T- 1502319	17-08-89
		KR-B- 9600479	08-01-96
US-A-4554088	19-11-85	CA-A,C 1254028	16-05-89
		DE-A- 3485332	23-01-92
		EP-A- 0125995	21-11-84
		EP-A- 0357593	14-03-90
		JP-B- 7006986	30-01-95
		JP-A- 60001564	07-01-85
		JP-A- 8009995	16-01-96
		WO-A- 8806632	07-09-88
		US-A- 4628037	09-12-86
		US-A- 4695392	22-09-87
		US-A- 4695393	22-09-87
		US-A- 4698302	06-10-87
		US-A- 4672040	09-06-87

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. nales Aktenzeichen

PCT/EP 96/02459

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C07H21/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C07H

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP,A,0 343 934 (ALCAN INT LTD) 29.November 1989 siehe das ganze Dokument ---	1-7,9-13
X	DE,A,43 07 262 (BERGEMANN CHRISTIAN) 8.September 1994 siehe das ganze Dokument ---	1-7,9-13
X	GB,A,2 116 206 (KMS FUSION INC) 21.September 1983 siehe das ganze Dokument ---	1-5,11
Y	WO,A,88 06633 (ARNOLD LYLE JOHN JR ;NELSON NORMAN CHARLES (US); REYNOLDS MARK ALA) 7.September 1988 siehe Seite 18, Zeile 21 - Zeile 27; Beispiele 1,2 --- -/--	1-13

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

11.Oktober 1996

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

05.11.96

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Bardili, W

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 96/02459

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	US,A,4 554 088 (WHITEHEAD ROY A ET AL) 19.November 1985 siehe das ganze Dokument ---	1-13
Y	ANAL. BIOCHEM., Bd. 175, 1988, Seiten 196-201, XP002015369 W. PYERIN ET AL.: "Filter-Supported Preparation of Phage DNA" in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-13
Y	NUCLEIC ACIDS RES., Bd. 22, 1994, Seiten 4543-4, XP002015370 T.L. HAWKINS ET AL.: "DNA Purification and Isolation Using a Solid-Phase" siehe das ganze Dokument -----	1-13

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 96/02459

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A-0343934	29-11-89	AT-T- 117829	15-02-95
		DE-D- 68920778	09-03-95
		DE-T- 68920778	18-05-95
		ES-T- 2066851	16-03-95
		JP-A- 2038318	07-02-90
		US-A- 5039559	13-08-91
DE-A-4307262	08-09-94	KEINE	
GB-A-2116206	21-09-83	US-A- 4448884	15-05-84
		CA-A- 1191096	30-07-85
		FR-A- 2522678	09-09-83
		JP-C- 1306775	13-03-86
		JP-A- 58165787	30-09-83
		JP-B- 60030510	17-07-85
		SE-B- 455310	04-07-88
		SE-A- 8301015	04-09-83
WO-A-8806633	07-09-88	AT-T- 107654	15-07-94
		AU-A- 1426988	26-09-88
		DE-D- 3850273	28-07-94
		DE-T- 3850273	29-09-94
		EP-A- 0281390	07-09-88
		ES-T- 2054797	16-08-94
		JP-T- 1502319	17-08-89
		KR-B- 9600479	08-01-96
US-A-4554088	19-11-85	CA-A, C 1254028	16-05-89
		DE-A- 3485332	23-01-92
		EP-A- 0125995	21-11-84
		EP-A- 0357593	14-03-90
		JP-B- 7006986	30-01-95
		JP-A- 60001564	07-01-85
		JP-A- 8009995	16-01-96
		WO-A- 8806632	07-09-88
		US-A- 4628037	09-12-86
		US-A- 4695392	22-09-87
		US-A- 4695393	22-09-87
		US-A- 4698302	06-10-87
		US-A- 4672040	09-06-87